

# Биологическая Химия

МЕТОДЫ

ДНК - ДИАГНОСТИКИ

# ДНК – технологии

**ДНК – технологии** используются в медицине для диагностики и лечения различных заболеваний, в т.ч. наследственных, создания лекарственных препаратов, создания генетического материала, идентификации личности.

## Выделения ДНК (Получение нативной ДНК).

1. быстрый лизис клеток,
2. удаление органелл,
3. разрушение белков специфическими протеазами,
4. ДНК экстрагируется из растворов
5. ДНК растворяется в буферном растворе.
6. ДНК фрагментируется.

**7. определение взаимного  
расположения фрагментов ДНК и  
локализации в хромосомах.**

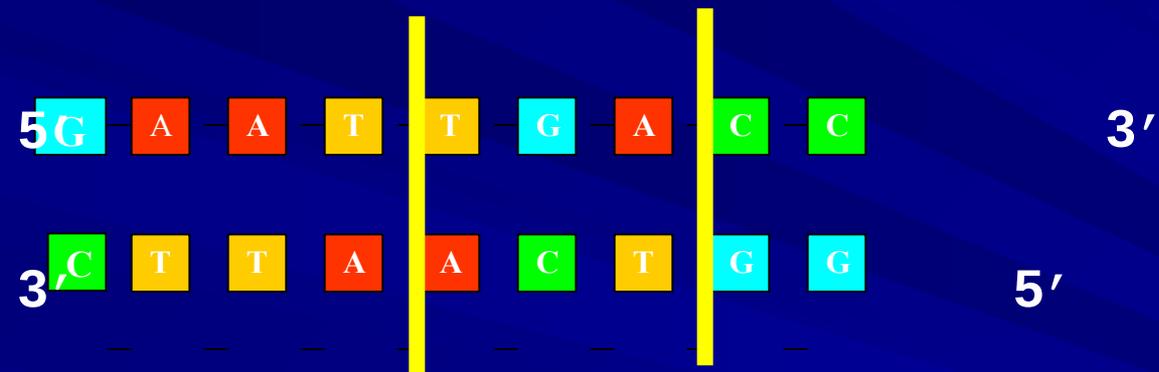
**8. определение первичной  
структуры ДНК.**

Специфические рестриктазы –  
(ферменты разрушающие ДНК) –  
рестрикционные эндонуклеазы  
бактериальных клеток.

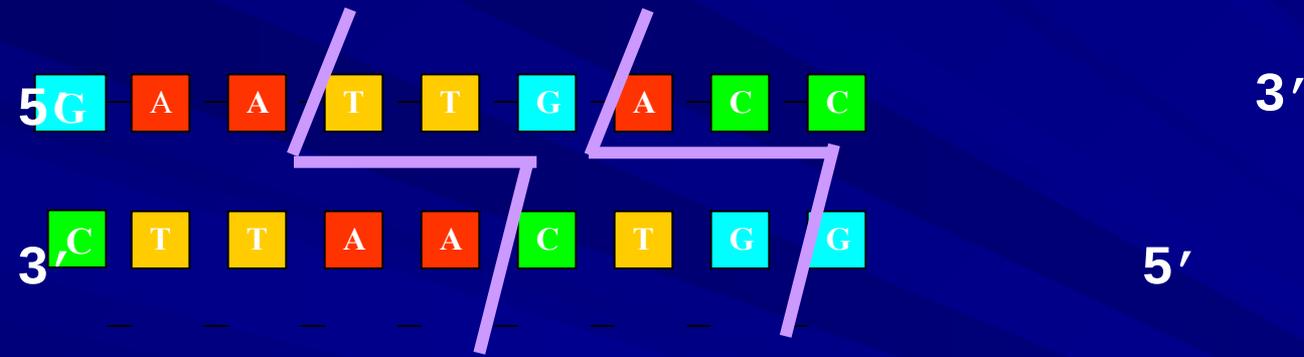
# Рестриктазы

узнают специфические последовательности состоящие из 4 – 6 или реже из 8 – 12 нуклеотидов в 2-х цепочечной молекуле ДНК и разрезают её в местах локализации этих последовательностей.

# Действие рестриктаз **1-го типа**, образование слепых концов



# Действие рестриктаз 2 – го типа, образование липких концов



**ДНК – идентификация  
специфических  
последовательностей.**

**Идентификация осуществляется путём  
гибридизации с мечеными ДНК -  
зондами.**

**ДНК – зонд используется для  
специфического связывания  
исследуемых участков генов.**

# **ДНК – зонд (ДНК – чип)**

**фрагменты однонитевой ДНК  
длиной от 15- 20 до 100 и  
выше 100 нуклеотидных  
звеньев со строго  
определённой первичной  
структурой.**

# Метод гибридизации по Саузерену –

используется для визуализации  
фрагментов ДНК.

Методики Нозерн – блоттинга и  
Вестерн – блоттинга для  
визуализации **соответственно РНК**  
и белков.

# Метод блотт – гибридизации:

Полученные в ходе рестриктазных реакций фрагменты ДНК подвергаются денатурации и переносятся на плотный носитель чаще всего на нитроцеллюлозный фильтр.

*(Процесс переноса - блоттинг).*

- Блоттинг за счёт капиллярных сил, электрического поля или вакуума.

- Гибридизация с ДНК или РНК – зондом, содержащим метку.
- Определение положения искомого участка ДНК.

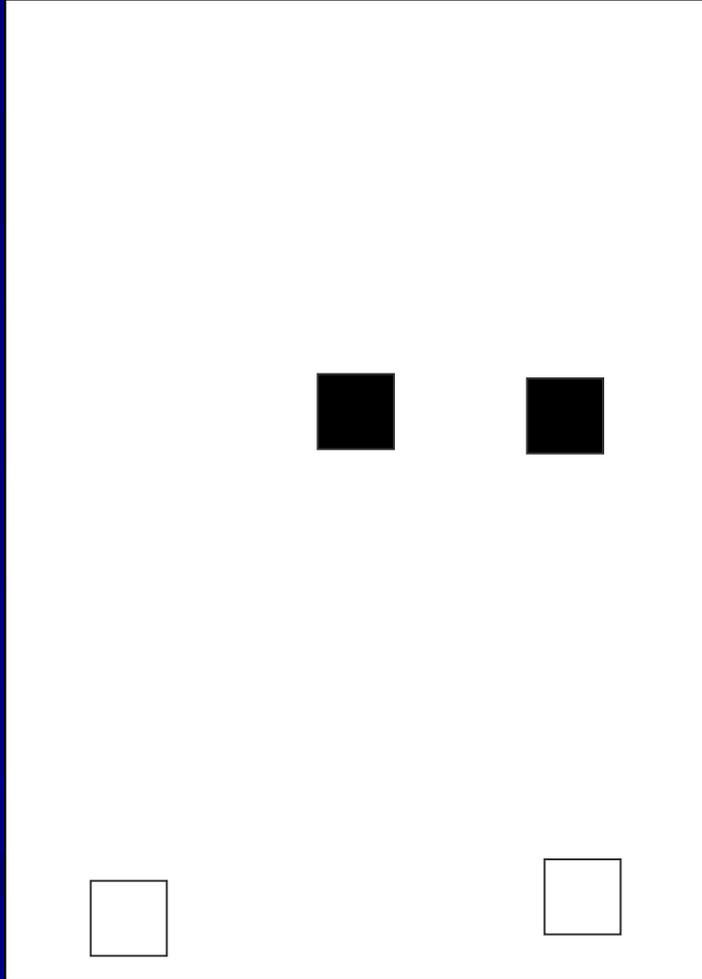
# Серповидно – клеточная анемия.

Миссенс – мутация связана с заменой в гене В – цепи гемоглобина триплета ГАГ на ГТГ, при этом в ходе трансляции вместо остатка глутаминовой кислоты в 6 - м положении В – цепи встраивается валин (В6 Глу → Вал).

AA

AS

SS



1,3  
килобазы

1,1  
килобазы

Пример радиоавтограммы после гибридизации с зондом к В – глобину

# Секвенирование

- Установление первичной структуры ДНК
- Методы секвенирования:
  - Химические
  - Ферментативные

## Методика дидезоксисеквенирования:

реакционные пробы ставятся в 4-х кюветах и в каждую добавляется следующие компоненты:

1. денатурированная однонитевая ДНК;

2. ДНК – полимераза;

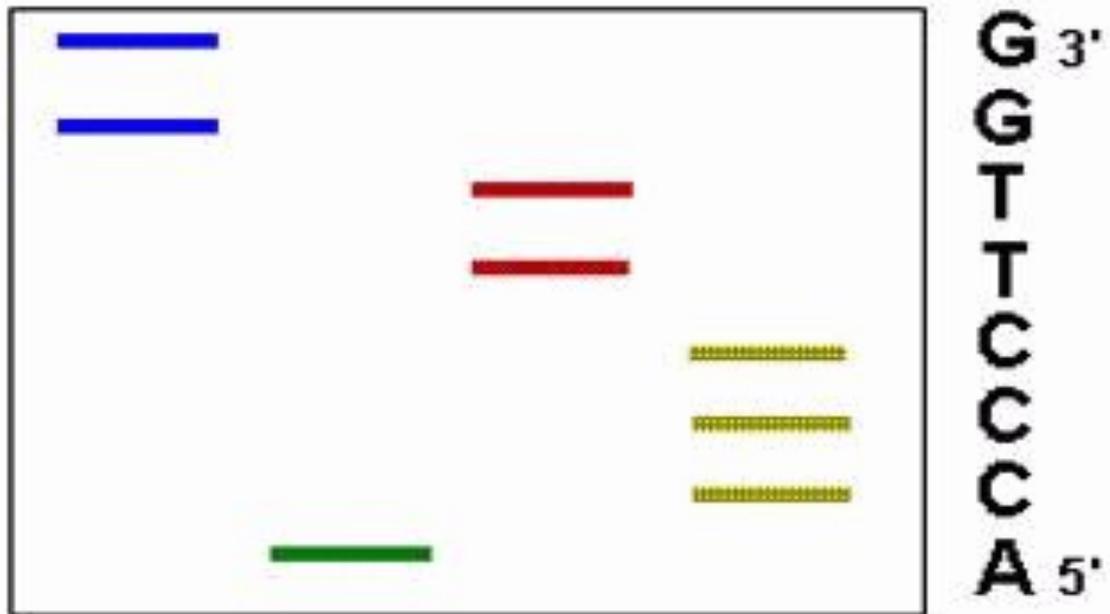
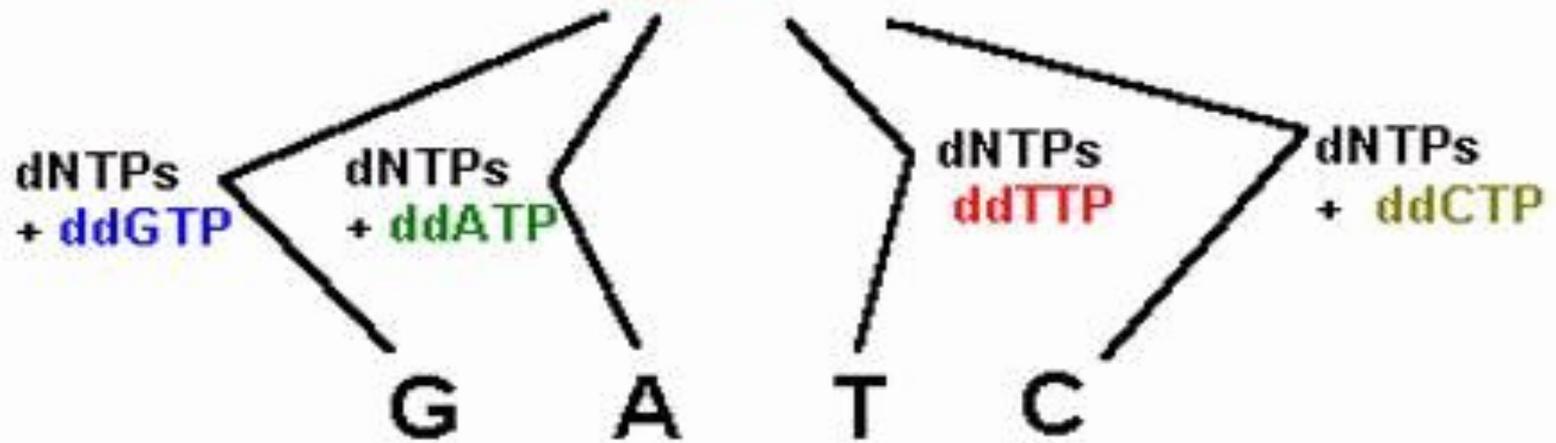
3. дНТФ: дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ;

+

1 Один из терминаторов -  
дидезоксинуклеозидтрифосфат: **ддАТФ, ддЦТФ,  
ддГТФ, ддТТФ**

# Дидезоксисеквенирование

Template: 3' -----GCATTGGGAACC----- 5'  
Primer: 5' -----CGTA 3'



# Получение рекомбинантных ДНК и их амплификация.

1. фрагментирование 2-х молекул ДНК, полученных из разных источников с образованием липких концов.
2. процедура – отжига, что приводит к образованию рекомбинантов, соединённых за счёт липких концов
3. сшивка липких концов ДНК – лигазой – с образованием рекомбинантной ДНК.

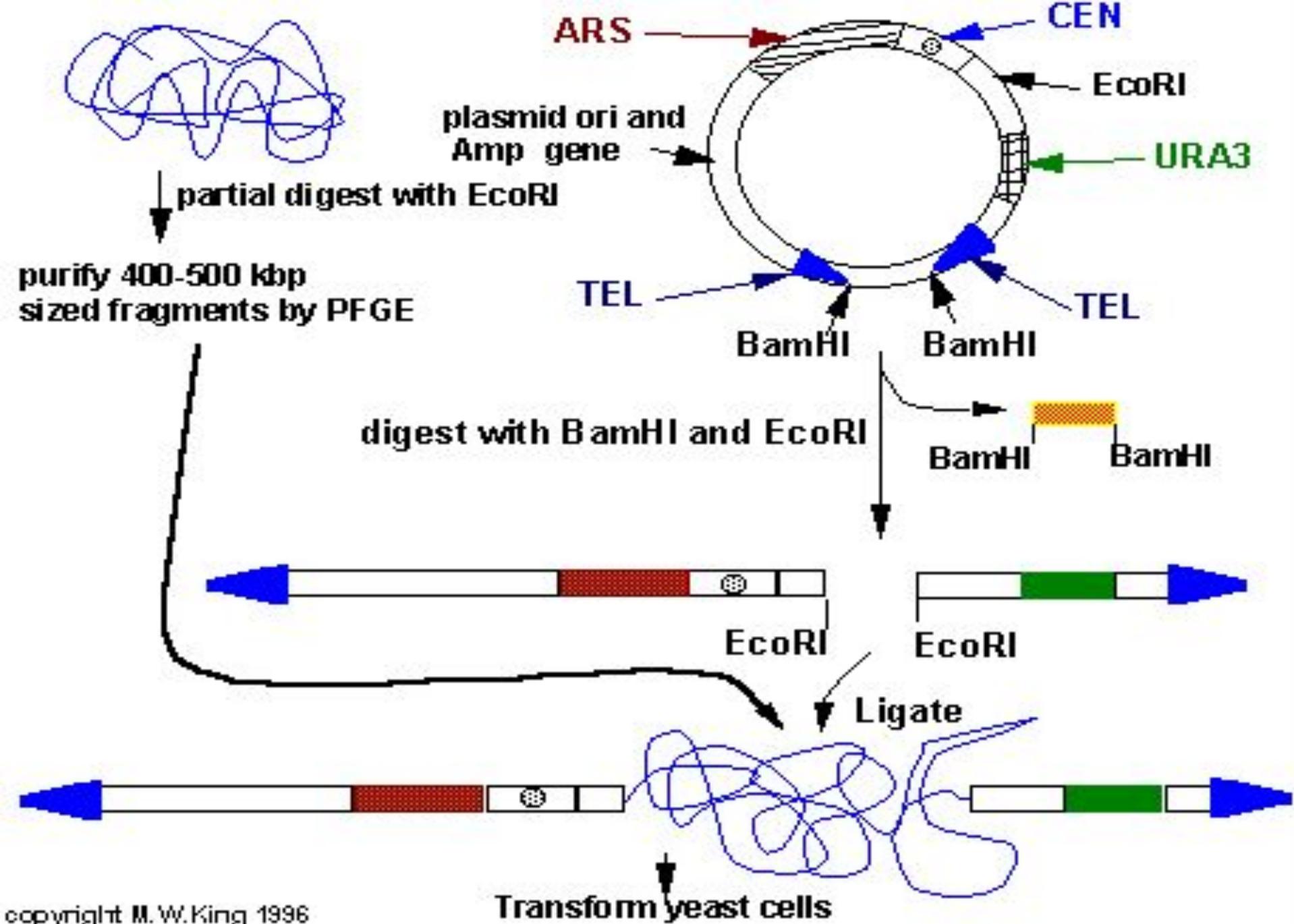
# Клонирование ДНК.

Клон – это популяция идентичных молекул.

Клонирование - встраивание нужного нам фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (вектор).

Вектор обеспечивает проникновение ДНК в бактериальные клетки, плазмиды, фаги, ретро – и аденовирусы.

При размножении трансформированных бактерий происходит увеличение числа копий введённого в плазмиду фрагмента ДНК.



**Геномная библиотека** - содержит  
все гены данного генома

ГОТОВИТСЯ ИЗ ТОТАЛЬНОЙ ДНК клеточной  
линии или ткани.

Для конструирования геномной  
библиотеки используются фаговые  
векторы, т.к. они позволяют клонировать  
протяжённые фрагменты ДНК.

# "Геном человека" ("Human Genome Project").

Основной задачей программы является построение исчерпывающих генетических и физических карт большого разрешения каждой из 24 хромосом человека и определение полной первичной структуры ДНК этих хромосом.

Генетические карты сцепления - одномерные схемы взаимного расположения генетических маркеров на индивидуальных хромосомах.

Генетические карты сцепления правильно отражают порядок расположения генетических маркеров на хромосомах,

Единицей измерения расстояний при генетическом картировании является один сантиморган (сМ), т.е. такое расстояние, при котором вероятность рекомбинации между генами равно 1%.

Физические карты генома отражают реальное расстояние между маркерами, выражаемое в парах оснований.

# Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Этот метод позволяет подвергать специфической амплификации *in vitro* участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК.

# Объекты исследования ПЦР

- Материалы из тканей, содержащие антигены различных инфекционных возбудителей (например: вирусные гепатиты, ИППП: герпес,, трихомониаз, хламидиоз и др.).
- Выявление онкомаркёров,

- Контроль качества лечения – пример хронизация процесса или латентное носительство,.
- ПЦР используется для выявления наследственной патологии, идентификации личности, установления отцовства, картирования генома.

ПЦР проводится в специальных приборах, которые называются амплификаторы ДНК.

Обычно с исследуемым образцом запускается 25 – 30 циклов ПЦР, в ходе которых число синтезированных копий ДНК достигает несколько миллионов.

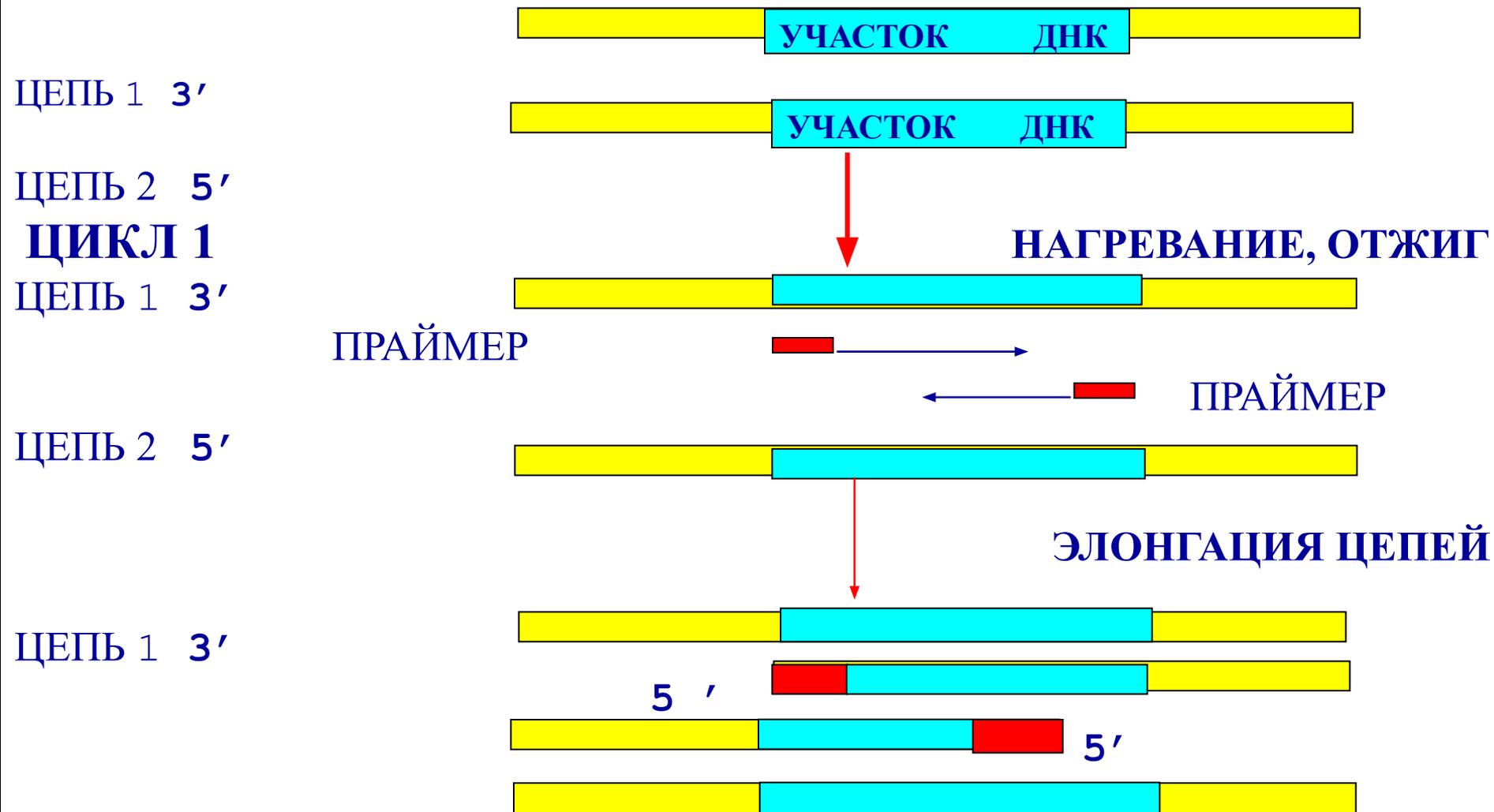
Участок исследуемой ДНК гибридизуют с 2 – мя искусственно синтезированными праймерами – олигодезоксирибонуклеотидными последовательностями длиной от 15 до 30 пар нуклеотидов, которые будут комплементарны 3' – концам пар нуклеотидов.

ПЦР протекает в буферном растворе, содержащим ионы магния.

Один цикл ПЦР включает 3 этапа:

1. Плавление
2. Гибридизация ДНК с праймерами
3. Элонгация термостабильной ДНК - полимеразой

# ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ



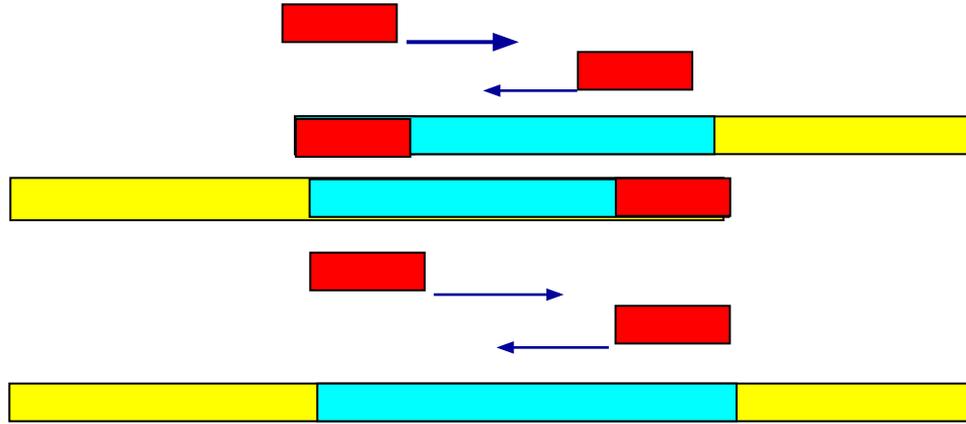
# ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ

## ЦИКЛ 2

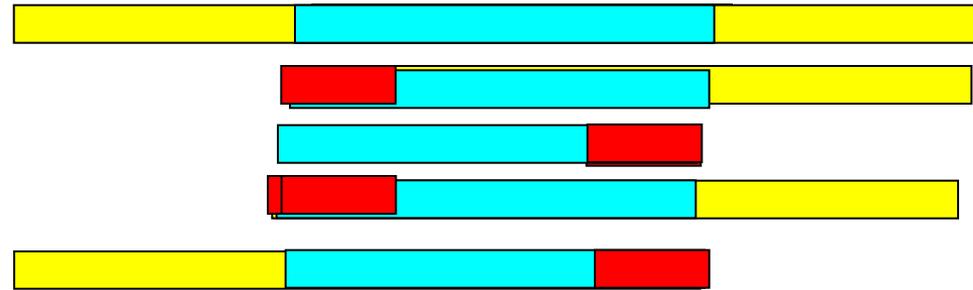
ЦЕПЬ 1 3'



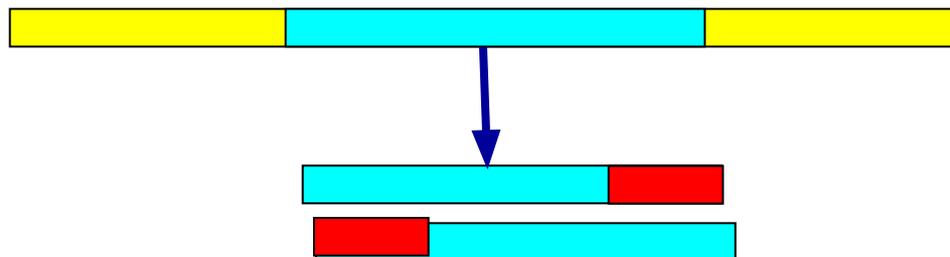
ЦЕПЬ 2 5'



ЦЕПЬ 1 3'



ЦЕПЬ 2 5'



# Специальная программа

## Genotyper-tm

позволяет автоматически соотносить информацию о интенсивности флюоресценции продуктов PCR с имеющейся информацией об изученных локусах.

Метод ПЦР позволяет создавать гибридные карты генома

# ПДРФ – Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

- гемофилия А, талассемия, ретинобластома и гранулематоз
- контроль проявленности генов у потомства гетерозиготных родителей по различным генам, например по гену серповидно – клеточной анемии и др. нарушений.
- Идентификация делеции в гене белка дистрофина (миодистрофия Дюшена)

Принцип метода основан на  
изменении деятельности известных  
рестриктаз.

# ПДРФ - анализ проводится в три этапа:

1. Выделение геномной ДНК

2. Рестрикция геномной ДНК специфической рестриктазой

3. Электрофоретическое разделение образующихся фрагментов с последующей идентификацией путём блотт – гибридизации по Саузерну.

1. Отсутствие рестрикции фрагмента ДНК с образованием более крупного фрагмента

2. При наличии рестрикции в полиморфном участке на электрофореграмме будет присутствовать фрагмент равный расстоянию между полиморфным участком рестрикции и одним из ближайших постоянных участков рестрикции.

# Генная терапия.

Заболевания вызванные функциональной недостаточностью продукта того или иного гена, можно лечить путём заместительной терапии.

Принцип метода заключается в клонировании гена в векторе, способном включится в геном клетки – хозяина.

Ген переносится в соматические клетки и потомкам не передаётся.

Внедрение гена в половые клетки животных приводит к появлению трансгенных животных, на которых исследуют экспрессию конкретных генов.